



Title	酵母の発育及び代謝に及ぼす凍結融解の影響
Author(s)	坂上, 康雄; SAKAGAMI, Yasuo
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 105-124
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17627
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p105-124.pdf



酵母の発育及び代謝に及ぼす凍結融解の影響*

坂 上 康 雄
(低温科学研究所 医学部門)
(昭和 34 年 7 月受理)

I. 緒 言

微生物に対する凍結の影響については、従来多数の報告^{1)~6)}があり、そのうち酵母細胞について行われた研究だけをあげてもかなりの数に上る。我々の研究室に於てもこれまでに形態的或は機能的な立場からいろいろと検討^{7)~12)}が行われてきたが、凍結による細胞障害の機序に関しては未だ明らかでない点が少なくない。

一般に細胞の凍結融解実験に於て、細胞が種々の障害をうけることは知られているが、そのうちで細胞の発育機能がどのような影響をうけるかについては、僅かに Proom & Hemmons¹³⁾ が種々の菌を用いて行つた実験で、凍結乾燥菌はその誘導期が延長すると述べたのに対し、Fry & Greaves¹⁴⁾ は *Paracolon bacillus* を用いて、その延長は菌数の差違によつて生じたもので、本質的には何等変質しておらないと述べている程度で、酵母については調べられていない。

著者は特にこの点に重点をおいて検討を試みた。例えば凍結融解によつてある程度菌は死滅する。しかし生残つた菌は果して正常と同様の生理機能を有するかどうか、特に発育能力に於て何等かの障害をうけていないか否かを検討するのが本実験の主たる目的である。

II. 実験材料並びに方法

1) 使用材料

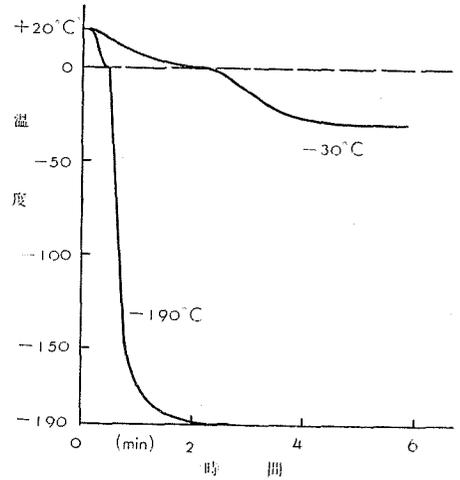
実験にはすべて *Saccharomyces cerevisiae* S 214 株を用いた。菌液調製に当つては、茄子型培養瓶を用いて麦汁寒天培地に +27°C、24 時間培養したものを滅菌蒸溜水で 3 回遠心洗滌 (3,000 r.p.m. 20 分) してから湿菌量を秤量し、一定濃度の菌の蒸溜水浮游液を作つた。従つて菌濃度は湿菌量を基準としたものである。一部の実験を除いては殆ど湿菌量 10 mg/cc 濃度の菌液を用いた。特に蒸溜水浮游液としたのは凍結実験を行う場合、なるべく関与する因子を少なくして実験条件を簡単にするためである。

2) 凍結融解

試料を凍結させるには塩化カルシウムのブライン (-30°C) 及び液体空気 (-190°C) を使用した。即ち菌浮游液を試験管 (内径 16 mm) に 2.0 cc 入れ、急速凍結の場合は液体空気に、

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 517 号

緩慢凍結の場合はブラインにそれぞれ浸し、前者では5分間、後者では10分間おいて充分にその温度に到達させた後、+10°Cの水槽に入れ試験管を振盪しながら融解した。その凍結曲線は第1図に示す通りで、これは記録直流電位差計(横河電機製作所ER-122型)と熱電対(銅・コンスタンタン)を用いて測定したものである。



第1図 酵母菌液の凍結曲線

3) 生菌数測定

菌液をそれぞれ適当な濃度まで希釈し、それを麦汁寒天培地に注加して平板培養し、48時間後に認められた集落数を測定した。

4) 醗酵能及び呼吸能測定法

醗酵能は醗酵時に発生する炭酸ガス量、呼吸能は呼吸時に消費する酸素量で表わした。

i) Warburg 検圧計を用いて発生するCO₂量及び吸収されるO₂量を測定した。使用した菌浮游液の濃度は実験の項でその都度示すが主として10 mg/ccのものを用い、基質としてはグルコースを使用した。O₂量測定時では呼吸時放出されるCO₂を吸収させるために20%苛性加里液を使用した。即ち容器内組成は全量3 ccで次の如くである。

O₂消費量測定時

菌 浮 游 液	1.5 cc	} ……主 室
グルコース液 (M/30)	1.0 cc	
苛性加里液 (20%)	0.5 cc	

CO₂発生量測定時

菌 浮 游 液	1.5 cc	} ……主 室
グルコース液 (M/30)	1.0 cc	
蒸 液 水	0.5 cc	……副 室

以上の様な反応系で、恒温槽の温度は27°C±0.1°C、振盪回数は1分間約100回として10分毎に検圧計の読みを測定し、60分間振盪してCO₂発生量、及びO₂消費量を測定した。

ii) O₂消費量測定 60分後の検圧計の読みからO₂消費量を求め、

iii) CO₂発生量測定 60分後の検圧計の読みをhとすれば、CO₂発生量X_{CO₂}は次の式で表わされる。

$$\begin{aligned}
 \text{即ち } h &= X_{\text{CO}_2}/K_{\text{CO}_2} - X_{\text{O}_2}/K_{\text{O}_2} \\
 h + X_{\text{O}_2}/K_{\text{O}_2} &= X_{\text{CO}_2}/K_{\text{CO}_2} \\
 X_{\text{CO}_2} &= K_{\text{CO}_2}(h + X_{\text{O}_2}/K_{\text{O}_2}) \dots\dots\dots (1)
 \end{aligned}$$

(1) の X_{CO_2} が呼吸及び醗酵によつて発生した CO_2 の総量である。

- 式中 K_{CO_2} …… CO_2 の容器恒数
 K_{O_2} …… O_2 の容器恒数
 X_{O_2} …… O_2 の消費量 (別の容器で測定した値)
 h …… KOH のない条件での検圧計の読み

そこで(1)の X_{CO_2} から X_{O_2} を差引くと、呼吸商を 1 と仮定した場合の酸素気中に於ける醗酵のみによる CO_2 発生量が得られる¹⁵⁾。

実験成績に於いて示した CO_2 量及び O_2 量はいずれも Q_{CO_2} , Q_{O_2} ではなく、試料の単位容量についての 60 分値である。これはすべて、対照に対する比較を問題としていること、菌濃度の差及び凍結融解菌と凍結融解菌に無処理菌を加えたものとの差を論ずる場合に好都合であるからである。

5) 放射性同位元素の強度測定法

麦汁寒天培地に予め 20,000 カウント/cc の割合に ^{32}P 又は ^{14}C グルコース (^{14}C の場合は更にグルコースを 3% の割合に加える) を加えてから菌を接種し、+27°C, 24 時間培養後その標識された菌を 3 回遠心洗滌 (3,000 r.p.m. 20 分) して一定濃度の菌液を作つた。

この標識された湿菌量 10 mg/cc の菌液を試験管に 2.0 cc 入れブライン (-30°C) 又は液体空気 (-190°C) で凍結融解した後、全量を高速度遠心沈澱管に移して抽出分割を行つた。即ち ^{32}P の場合は Schneider^{16),17)} 法により、先ず凍結融解菌液を遠心沈澱 (9,000 r.p.m. 20 分) し、その上清を試料皿に移して水溶性抽出分割とし、更に沈澱を冷-TCA, アルコール・エーテル, 熱-TCA と順次に抽出分割を行い、最後に残つた沈澱を残渣分割とした。 ^{14}C グルコースの場合は前述と同様の方法で水溶性抽出分割を得た後、熱-アルコール・エーテル抽出分割のみを行い、残りの沈澱を残渣分割とした。以上の様にして試料皿に移した各抽出分割を +50°C の電気乾燥機上に載せ、風乾してから Geiger-Müller Counter (科研製) で ^{32}P 及び ^{14}C グルコースの放射能強度を測定した。

III. 実験成績

実験 I 凍結融解菌の生残数

10 mg/cc 濃度の酵母菌液 2.0 cc を試験管に入れ、ブライン (-30°C) 及び液体空気 (-190°C) で凍結した後直ちに +10°C の水槽で融解した生残率は第 1 表に示す通りである。

この表でわかる様に、温度の低い方が生残率も低く、-30°C では 43.0% であるのに -190°C ではわずかに 1.5% にすぎない。

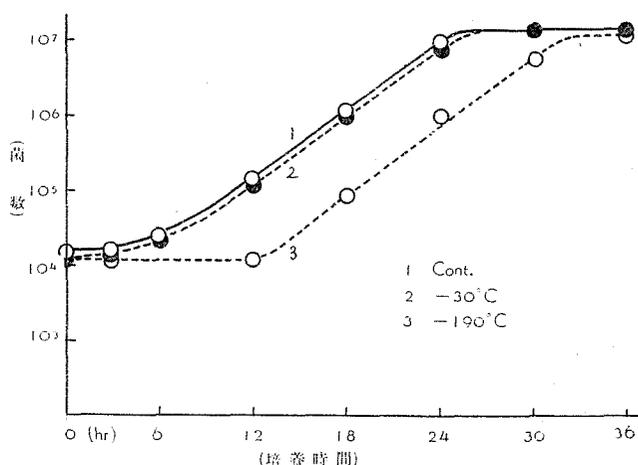
即ち冷却速度によつて生残菌に差を生ずることは既に知られている通りであるが、この生残菌のもつ発育能力が果して正常と変つていないか否かを次にしらべた。

第 1 表 凍結融解菌の生残率

凍結処理	生残率 (%)
Cont.	100.0
- 30°C	43.0
-190°C	1.5

実験 II 凍結融解菌の発育曲線

10 mg/cc の菌液を -30°C 及び -190°C で凍結融解した後、直ちにそれぞれ 1.0 cc を麦汁培地 49.0 cc に加えて培養し ($+27^{\circ}\text{C}$)、3 時間毎又は 6 時間毎に一部を取り出し、plate count 法で生菌数を算定して発育曲線を求めた。この場合始めの生菌数を等しくするために第 1 表の生残率によつて、無処理の対照菌液は 70 倍稀釈、 -30°C 凍結融解菌液は 30 倍稀釈して、 -190°C 凍結融解菌液の生残菌数と等しくしてから麦汁培地に加えた。



第 2 図 凍結融解菌の発育曲線

結果は第 2 図に示した様に、無処理の対照菌と -30°C 凍結融解菌は同様の発育曲線を示すのに対して、 -190°C 凍結融解菌は約 12 時間も誘導期が延長している。しかしそれ以後は比較的急速に上昇し対照と同じ様な傾斜の対数増殖期を示した。このことから、 -30°C 処理の生残菌は無処理対照のものとはほぼ同様であるが、 -190°C まで処理された生残菌はその発育の阻害されていることがわかる。

即ち、 -190°C 凍結融解菌の誘導期が延長することについては、生残菌自身の発育機能に障害をうけているか、或いはメジウム中に共存する死滅した菌体又は死滅菌体から游出した成分が阻害的に働くのかのいずれかであろうと思われたので、次の様な実験を行った。

実験 III 凍結融解菌の発育が遅延する理由の吟味

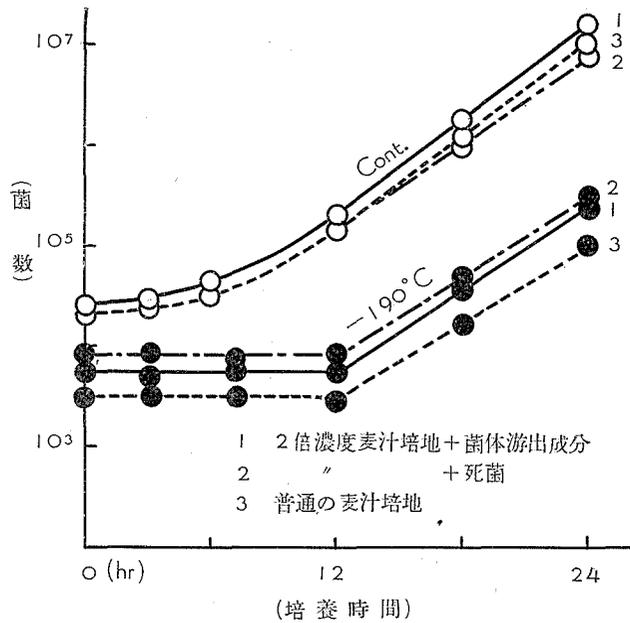
1) 死菌及び死菌体よりの游出成分の影響

a) 死菌及び游出成分を添加した場合

先ず 100 mg/cc の菌液 10.0 cc を -190°C で凍結融解 15 回繰返して菌を完全に死滅させ (plate count 法で確認)、それを遠心沈澱 (9,000 r.p.m. 20 分) してその上清を游出成分とし、残渣を 2 回遠心洗滌 (9,000 r.p.m. 20 分) してから、全量 10.0 cc になるように蒸留水で再浮游されたものを死菌液として用いた。亦麦汁培地としては予め煮つめて 2 倍濃度に濃縮したものを

用い、他の実験に於ける培地濃度と等しくなる様にした。

次に 10 mg/cc の菌液を -190°C で凍結融解し、その 1.0 cc を 2 倍濃度麦汁培地 5.0 cc に加え、更に蒸溜水、死菌液又は游出成分を 4.0 cc 加えて全量 10.0 cc とし、前述と同様の方法で発育曲線を求めた。この場合前回の実験と異なり、培地容量を 10.0 cc にしたこと及び麦汁



第3図 死菌及び菌体游出成分を加えた場合の発育曲線

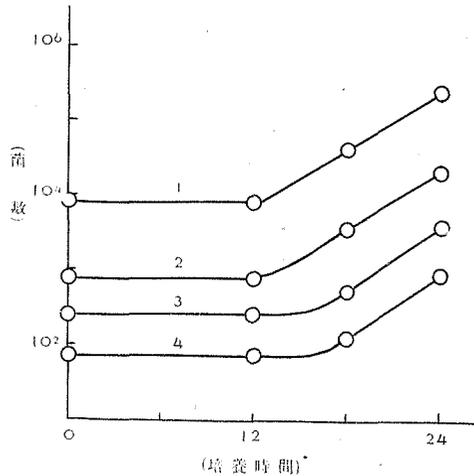
を煮つめて 2 倍濃度にしたために、これらの影響が考えられたので、普通の麦汁培地での発育曲線も一緒に求めてその影響を調べてみた。

結果は第 3 図に示した様に、対照菌、凍結融解菌共に第 2 図と全く同じ傾向を示し、死菌及び游出成分を加えた影響はなかつた。亦培地容量の減量及び麦汁を濃縮した影響も見られなかつた。

b) 凍結融解菌液を稀釈した場合

凍結融解菌液を稀釈することによつて、死菌及び游出成分の影響の有無を更に詳しく検討してみた。

10 mg/cc の凍結融解菌液 (-190°C) を適当に稀釈してから、その 1.0 cc を麦汁培地 49.0 cc



第4図 凍結融解菌液を稀釈した場合の発育曲線

1. 50 倍, 2. 500 倍, 3. 1,000 倍, 4. 10,000 倍にそれぞれ稀釈

に加え、菌液の最終濃度が50倍、500倍、1,000倍及び10,000倍稀釈になるようにした。このようにして得た発育曲線は第4図に示す通りである。

この図でわかる様に、菌液を稀釈しても、やはりその誘導期は第2図と同様に約12時間延長した。唯1,000倍稀釈及び10,000倍稀釈濃度菌液では更に延長している様に見えるが、これは一般に接種菌数が少なくなるほど誘導期が延びるという通例によるものと思われた。

以上二つの実験結果からは、死菌及び游出成分の阻害的な作用は認められなかつた。従つて、凍結融解菌の誘導期の延長は死菌又は菌体游出成分の影響ではなく、生残菌自身の性質の変化によるものと考えられる。そこで次の検討に移つた。

2) 凍結融解後1代培養した菌の発育曲線

まず10 mg/ccの凍結融解液(-190°C)を麦汁培地で+27°C、36時間培養した後、3回遠心洗滌して適当な濃度の菌液を作り、これを更に麦汁培地に加えて発育曲線を求めてみると第5図の通りになる。

この図に見られる様に、凍結融解菌の誘導期は延長せず、対照と殆んど同じような発育曲線を示し、正常に復していることがわかつた。

凍結融解後1回の培養で回復することからもわかる様に、当該菌だけの障害であつて、次の代にはうけつがれない性質のものであり、従つて凍結融解処理によつて遺伝的な変質を起したとは考えられない。

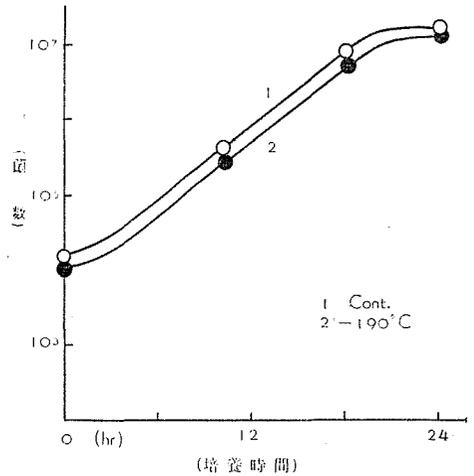
3) 凍結融解菌を孵置した場合の影響

a) 凍結融解菌液をそのまま孵置した場合

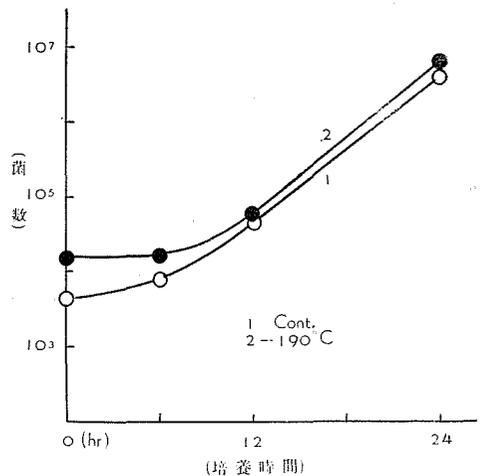
10 mg/ccの凍結融解菌液(-190°C)及び無処理の対照菌液をそのまま+27°C、12時間孵置してから、麦汁培地に加えて発育曲線を求めると第6図の通りになる。

この図に見られる様に、凍結融解菌の誘導期はかなり短縮しているが、それでも対照に比較すると約6時間も延長している。

即ち凍結融解処理直後の菌に比較して、+27°C、12時間孵置によつて多少回復するとはいえ、正常にまで戻らないということは、生残菌自身に何らかの本質的な障害のあることが想像



第5図 凍結融解後1代培養した菌の発育曲線



第6図 凍結融解菌液を孵置した後の発育曲線

される。しかも麦汁培地中での誘導期の延長ということは、その間に凍結融解によつてうけた障害を修復するのに要する時間であるとも考えられる。次にその点の吟味を行つた。

b) 凍結融解菌にグルコース又は磷酸加里を加えて孵置した場合

10 mg/cc の凍結融解菌液 (-190°C) を 2 回遠心洗滌して菌体内からの游出成分をとり除いた後、5% グルコース液 (G), M/30 KH_2PO_4 + 5% グルコース液 (G+P), M/30 KH_2PO_4 液 (P) 及び蒸溜水 (W) のそれぞれに再浮游させて再び 10 mg/cc の菌液を作つた。以上の菌液をまずそのまま +27°C, 12 時間孵置してから麦汁培地に加え、前述の方法で発育曲線を求めた。

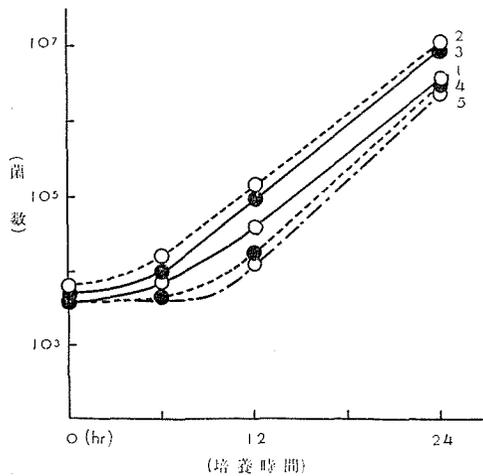
結果は第 7 図に示した様に、(G+P) および (G) 中に孵置した場合は、培地に移植すると直ちに対数期がはじまり無処理の対照とほぼ同様な発育曲線を示すが、(P) 及び (W) では誘導期は明らかに延長し、(W) の如きは約 8 時間も延長した。

即ち同様に孵置しても、そのメジウムが (G) の時では (G+P) のものと同程度に発育は 12 時間で完全に回復するが、(P) 及び (W) では僅かしか回復しないことから、発育の回復には磷酸加里よりもグルコースの存在が非常に必要であることがわかつた。従つてグルコースは発育の回復にエネルギー源として利用されていると考えられるので、次に孵置温度を変えてみた。

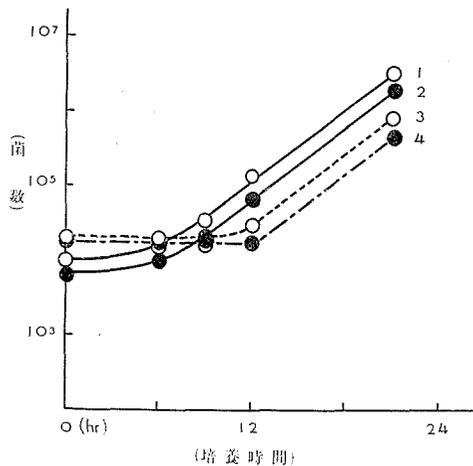
c) 孵置温度を変えた場合

前述の様にして、5% グルコース液に再浮游させた凍結融解菌液 (-190°C) を +27°C, +10°C 及び 0°C で 12 時間孵置し、又対照としては無処理の 5% グルコース浮游菌液を +27°C 及び 0°C で 12 時間孵置した後、麦汁培地に加えて前述の方法で発育曲線を求めた。

結果は第 8 図に示した様に、孵置期間中の温度の影響は明らかであり、温度が低くなるほど誘導期は延長した。即ち、+27°C に於いては第 7 図に示した様に延長しないが、+10°C では約 6 時間、殊に 0°C では 12 時間も延長して、-190°C 凍結融解菌液を直ちに麦汁培地に加え



第 7 図 凍結融解菌にグルコース又は磷酸加里を加えて孵置した後の発育曲線
1. 対照, 2. Glucose+ KH_2PO_4 , 3. Glucose, 4. KH_2PO_4 , 5. 蒸溜水



第 8 図 孵置温度を変えた場合の発育曲線
1. 対照 (0°C, 27°C), 2. Glucose (27°C), 3. Glucose (10°C), 4. Glucose (0°C)

たところの発育曲線(第2図)とはほぼ同じであつた。しかし無処理では温度の影響で誘導期が伸縮する現象は全くみられなかつた。

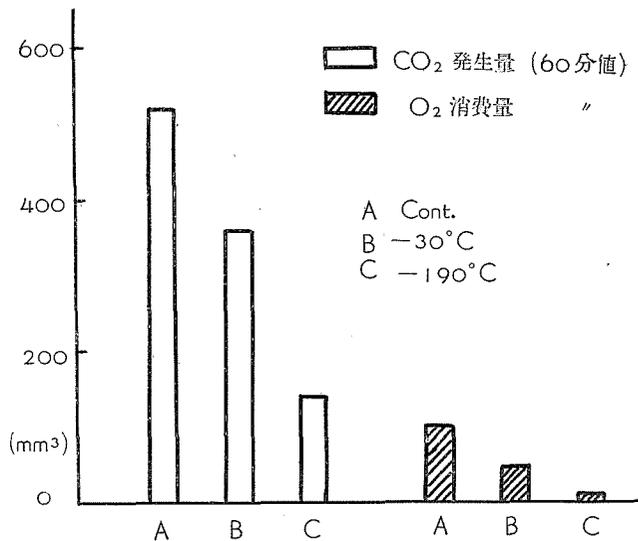
この孵置温度の低いほど発育の回復が遅れるということは、孵置期間中にグルコースがエネルギー源として利用されていることである。このことは前に述べた様に、生残菌はそのうけた障害の修復を完了してから始めて発育増殖するのであろうとの想像を裏書きするものと思う。

以上の実験結果を要約すると、誘導期の延長の原因は菌液中に含まれる死菌や菌体游出成分の影響によるものではなくて、生残菌自身の本質的な代謝障害と考えられる。

実験 IV 凍結融解菌の異化代謝能

酵母の代謝機能は種々多数あるが、その中で特に異化代謝能(醗酵能及び呼吸能)について、凍結融解の影響をしらべてみた。

10 mg/cc の菌液を -30°C 及び -190°C で凍結融解し、前述の方法で60分間の CO_2 発生量及び O_2 消費量を測定した。



第9図 凍結融解菌液の異化代謝能

結果は第9図に示した様に、凍結融解すると CO_2 発生量、 O_2 消費量共に低下した。凍結温度との関係では、 -30°C 凍結融解菌より -190°C 凍結融解菌の方がはるかに少なかつた。即ち、 CO_2 発生量では、対照が 522.0 mm^3 であるのに対して -30°C のものは 358.0 mm^3 、 -190°C のものは 142.5 mm^3 であり、又 O_2 消費量では、対照は 102.0 mm^3 、 -30°C は 46.0 mm^3 、 -190°C は 15.0 mm^3 であつた。しかし、生残率を CO_2 率又は O_2 率と比べ、死菌が異化代謝を行なわないものとして生菌一個あたりの異化代謝能を計算すると、第2表に見られる様に、

第2表 凍結融解菌のCO₂率及びO₂率と生残率との比

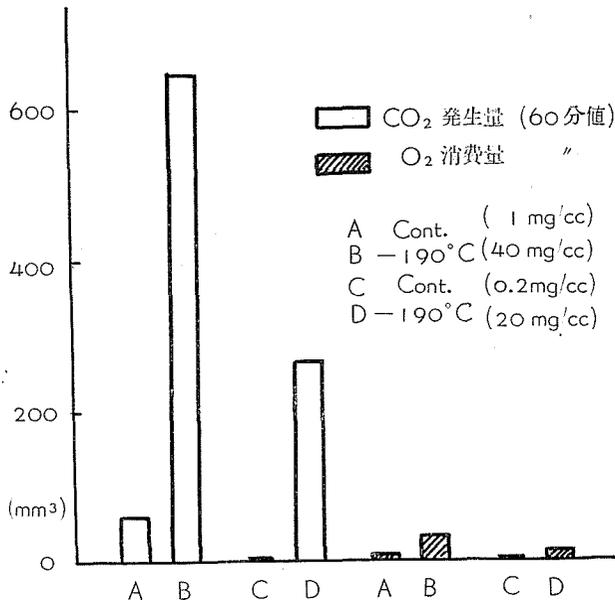
凍結処理	生残率 (%)	CO ₂ 率 (%)	O ₂ 率 (%)	CO ₂ 率/生残率	O ₂ 率/生残率
Cont.	100.0	100.0	100.0	1.0	1.0
-30°C	43.0	72.5	45.1	1.7	1.1
-190°C	1.5	27.5	14.7	18.3	9.8

-30°Cのものは対照に比較してわずか1~2倍であるのに、-190°Cは約10~20倍近くの値を示した。

この結果は、処理後の生残菌のみが異化代謝を行うとすれば、生残菌は無処理菌の約20倍近くの大きな代謝能を有することになる。このような現象がみられるについては次の様な原因が考えられる。1)生残菌自身の機能が增大したこと、2)凍結融解によつて生じた死菌及び菌体游出成分を生残菌が利用すること、3)死菌にも代謝作用が残っていること、等でこれらの点を検討するために更に次の様な実験を行った。

1) 凍結融解菌液とその生残菌数に等しい無処理正常菌液との比較

死菌及び游出成分の影響を見るためには、まず凍結融解菌液とその生残菌数に等しい無処理の正常菌液とについて、異化代謝能を比較する必要がある。このためには、生残菌数に等しい無処理菌液の異化代謝能を測定し得ることが必要なので、凍結融解には10 mg/ccよりも高濃度の菌液を用いた。



第10図 凍結融解菌液とその生残菌数に等しい正常菌液との比較

即ち、40 mg/cc, 20 mg/cc の菌液を -190°C で凍結融解し、又この生残菌数と同数になるような無処理の正常菌液も調製して、 CO_2 量及び O_2 量を測定した。この場合生菌数はできるだけ一致させるように努めたつもりでも、どうしても多少の差はできるので、かなり多数例の実験を行い、処理菌液と正常菌液の生菌数の等しいものだけをとりあげた。

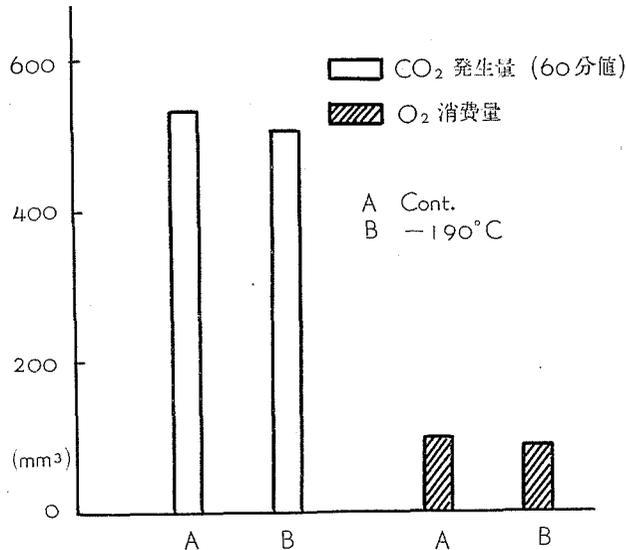
その結果は 40 mg/cc 凍結融解菌液の生残菌数に相当する無処理正常菌液は 1 mg/cc, 20 mg/cc に対しては 0.2 mg/cc となり、それぞれの代謝ガス量は第 10 図に示すように、正常菌液は凍結融解菌液に比較して、はるかに小さい異化代謝能を示した。殊に 0.2 mg/cc の正常菌では測定し得ぬ程少なかった。

このことから、凍結融解菌の示す代謝能は生残菌だけによるのではなくて、前記の他の因子も関与しているであろうことが想像される。

実験 V 凍結融解菌の異化代謝能がその生残菌数に比較して増大している理由の吟味

1) 凍結融解後 1 代培養した菌の異化代謝能

まず 10 mg/cc の凍結融解菌液 (-190°C) を麦汁寒天培地で $+27^{\circ}\text{C}$, 36 時間培養した後、3 回遠心洗滌して再び 10 mg/cc の菌液を作り、 CO_2 量及び O_2 量を測定すると第 11 図の通りになる。



第 11 図 凍結融解後 1 代培養した菌の異化代謝能

この図に見られる様に、凍結融解菌の CO_2 量、 O_2 量は対照と殆んど同じような値を示し、正常に復していることがわかった。

凍結融解後 1 回の培養で正常に復することからもわかる様に、処理された時の当該菌だけの問題であり、従つて凍結融解によつて遺伝的な性質の変化を起したために生ずる現象とは考

えられない。

2) 死菌及び死菌体よりの游出成分の影響

a) 正常菌に死菌液を加えた場合

次に、正常菌に凍結融解完全死菌液を加えることによつて、正常菌の異化代謝能が如何に影響されるかをみた。

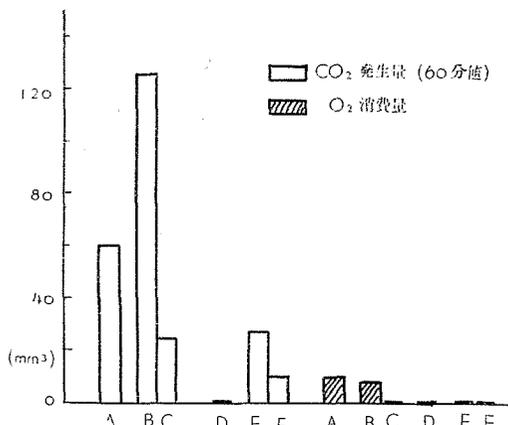
即ち、40 mg/cc, 20 mg/cc の菌液を凍結融解(-190°C) 15 回繰返し、完全に死滅させた菌液 4.5 cc に、1 回だけ凍結融解した場合の生残菌数と同数になるように、10 mg/cc 及び 2 mg/cc の正常菌液 0.5 cc 加えて、CO₂ 量及び O₂ 量を測定した。

なお 15 回凍結融解死菌液にも CO₂ 発生能があるが、それを加算して考えても、

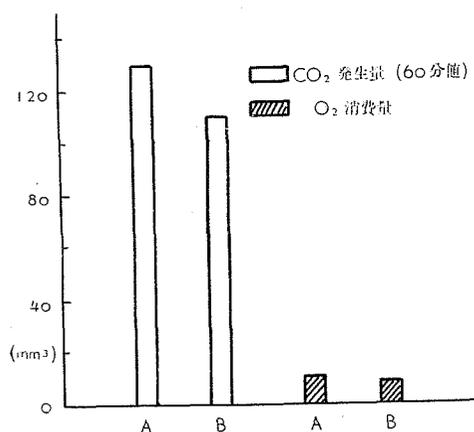
結果は第 12 図に示した様に、無処理の正常菌液に比較して、同数の生菌に凍結融解死菌液を加えたものの方がはるかに高かつた。従つて凍結融解によつて死滅した菌体又は菌体成分が生残菌の代謝機能に影響を及ぼしていることが想像される。

b) 凍結融解菌液にその生残菌数と同数の正常菌を加えた場合

前項の実験で、凍結融解死菌液を加えることによつて、生菌の異化代謝能は増大することがわかつたが、しかしこの場合は CO₂ 量が 60.5 から 100 になる程度で、2 倍にも達しないくらいであるから、この増大率から見ると、1 回凍結融解した菌液の代謝能が無処理の正常菌の約 20 倍にもなることの説明にはならない。そこで同じ死菌液でも、凍結融解 1 回のもものと 15 回のもとのでは、質的に異なるためではないかと考えられたので、次のような方法で更に検討した。



第 12 図 正常菌に死菌液を加えた場合の異化代謝能
 A. 1 mg/cc 対照 B. A+40 mg/cc 菌凍融 15 回
 C. 40 mg/cc 菌凍融 15 回 D. 0.2 mg/cc 対照
 E. D+20 mg/cc 菌凍融 15 回
 F. 20 mg/cc 菌凍融 15 回



第 13 図 凍結融解菌液に正常菌を加えた場合の異化代謝能
 A. 10 mg/cc 凍融. B. A+0.2 mg/cc 対照

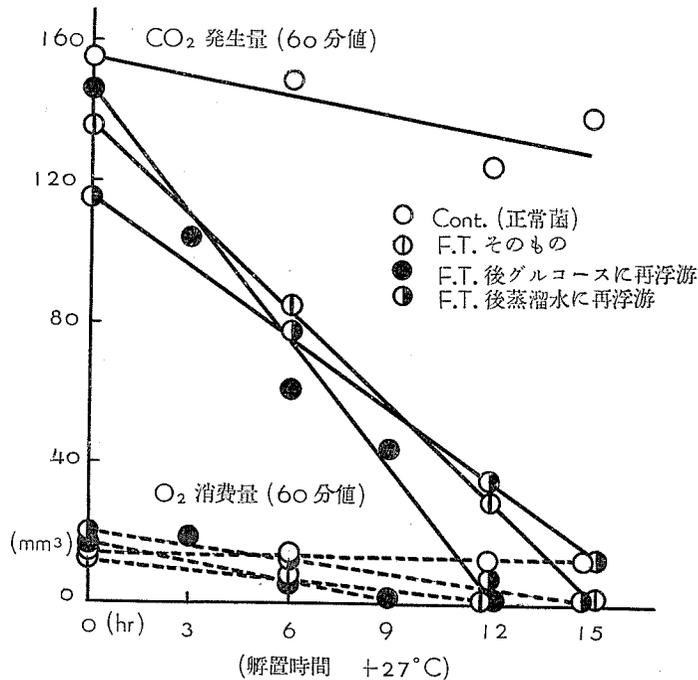
10 mg/cc の 1 回凍結融解菌液(-190°C) 4.5 cc に、更に 2 mg/cc の正常菌液 0.5 cc を加えて生菌数が 2 倍になるようにし、CO₂ 発生量及び O₂ 消費量を測定した。

結果は第 13 図に示した様に、凍結融解菌液に正常菌を加えたものは、生菌数は 2 倍であるにも拘らず、凍結融解菌液だけのものより逆

に少なかった。この場合、0.2 mg/cc の正常菌液の代謝能は殆んど測定し得ぬ程小さいものであり、また最初に正常菌液を加えたため凍結融解菌液自身は 1/10 量だけ稀釈されているわけなので、その分を補正すると $131.5 - 131.5 \times 1/10 \doteq 112.5$, $11.0 - 11.0 \times 1/10 \doteq 8.0$ というように、正常菌を加えても加えない前のものと殆んど差がないことになる。従つて凍結融解 1 回の菌液中の死菌や菌体游出成分は生菌に対して何ら影響していないということになる。しかしこの様な吟味でもまだ次のような疑問は残る。即ち死菌や菌体游出成分は正常菌には利用されないが、凍結融解生残菌によつては利用されるのではないかということである。この点の解明は今のところ甚だ困難である。

3) 凍結融解菌液を孵置した場合

10 mg/cc の凍結融解菌液 (-190°C) を次のような浮游液にして、 $+27^{\circ}\text{C}$ で孵置し 3 時間毎にその一部をとり出し、 CO_2 量及び O_2 量を測定した。即ち無処理の正常菌を対照とし、凍結融解したそのままのもの、5% になるようにグルコースを加えたもの、及び凍結融解後 2 回遠心洗滌し蒸留水に再浮游したもののこれら四者を孵置したのである。



第 14 図 凍結融解菌液を孵置した場合の異化代謝能

結果は第 14 図に示した様に、対照が殆んど変らないのに比較して、凍結融解菌は時間の経過と共に異化代謝能は低下し、12 時間以後では遂に測定し得ぬ程小さくなった。このように孵置することによつて、代謝能が急激に低下することは、凍結融解によつて菌は死滅しても処理直後では未だ相当に代謝能を有しており、それが時間の経過と共に急激に消失することを

意味するものと思われる。しかしこの場合でも、生残菌そのものの異常代謝を否定するわけにはゆかない。

以上の実験結果を要約すると、凍結融解菌液の異化代謝能(殊に -190°C の場合)が無処理の正常菌に比較して大きく見える理由は生残菌自身の機能の異常昂進によると考えるよりも、むしろ死滅した菌であつても、凍結融解直後では未だ相当に異化代謝能を有していると思われることと、その他一部には生残菌が同じ菌液中に産生された死菌体や菌体よりの游出成分を基質として利用することによると考えるのが妥当であろう。

実験 VI ^{32}P 及び ^{14}C グルコースを追跡子として用いた実験

1) ^{32}P を用いた場合

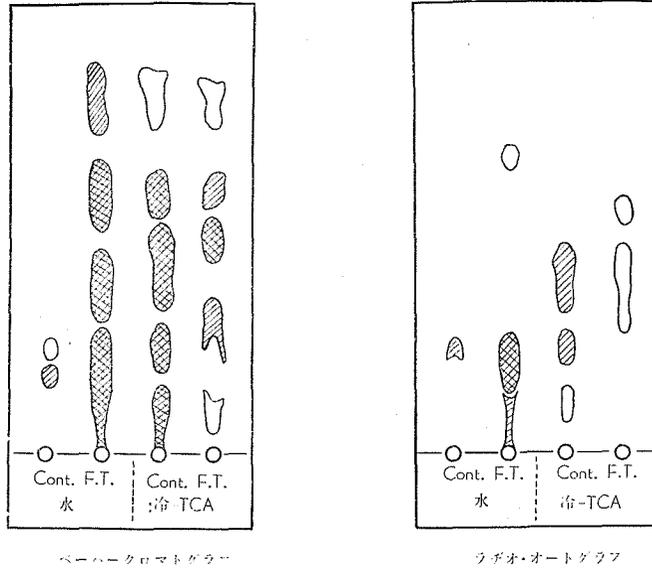
予め ^{32}P を含む培地で培養して標識した 10 mg/cc の菌液を -30°C 、 -190°C で凍結融解した後、前述の Schneider 法によつて水溶性分割、冷-TCA 分割、アルコール・エーテル分割、熱-TCA 分割、残渣分割の 5 抽出分割を行い、各分割中の ^{32}P の強度を測定した。

抽出法 \ 処理	Cont.	-30°C	-190°C
水	237	937	1121
冷-TCA	1585	1017	835
アルコール・エーテル	93	70	72
熱-TCA	555	535	379
残渣	180	185	152
計	2650	2744	2559

第 15 図 凍結融解処理による細胞組成の変化
(数字は ^{32}P の relative activity を示す)

結果は第 15 図に示した様に、対照と比較して主な相違点は水溶性抽出分割と冷-トリクロール醋酸(TCA)抽出分割のところであり、それら以外の抽出分割にはあまり差がなかつた。又 -30°C のものと -190°C のものとの間では、量的な差は認められたが質的な差はなかつた。即ち対照に於ける分割では、水溶性分割は少なく冷-TCA 分割は大きいのに対して、凍結融解菌液では逆に水溶性分割は大きく冷-TCA 分割は少なくなつてゐる。このことから凍結融解処理によつて、低分子の化合物(糖, 游離脂肪酸, エステル, 塩基等)が溶出し易くなると考えられた。

この点を更に検討するために、予め ^{32}P で標識した 100 mg/cc の菌液を凍結融解(-190°C) 10 回繰返した後、水溶性分割及び冷-TCA 分割を 5:1 ブタノール醋酸液(水飽和, pH 4.5)を溶媒として、ペーパークロマトグラフィを行い、この濾紙にニンヒドリン反応させたものの摸写図及びこの濾紙から得たラジオ・オートグラムの摸写図を第 16 図に示した。



第16図 ^{32}P を用いた場合のペーパークロマトグラム及びラジオオートグラフの横写図。スポットの網目斜線、白はそれぞれ発色の強度、又は放射能の強度が、強、普通、弱であることをあらわす。

これらの図から次の様なことが観察される。即ち、酵母菌液は凍結融解によつて、水溶性の含燐アミノ化合物が多量に水溶液となり、又無処理では水溶性でない数種のアミノ化合物(燐を含まぬ)も水に抽出される様になる。しかも前の実験結果と併せると、凍結融解によつて水溶性化される物質は殆ど無処理正常菌の冷-TCA 分割に属するものであることがわかる。

2) ^{14}C グルコースを用いた場合

-190°C 凍結融解菌の誘導期のおくれるのがグルコース添加によつて正常に復することや、 ^{32}P での実験で、凍結融解によつて糖も溶出することが認められたので、 ^{14}C グルコースを用いてこれらの点についての吟味を行った。

予め ^{14}C グルコースを含む培地で培養して標識した 10 mg/cc の菌液を -190°C で凍結融

抽出法	処 理		処 理	
	Cont.	-190°C ⁽¹⁾	Cont.	-190°C ⁽²⁾
水	30	140	160	560
熱-アルコール-エーテル	70	70	60	40
残 渣	690	590	390	120
計	790	800	610	720

第17図 凍結融解処理による細胞組成の変化

(数字は ^{14}C グルコースの relative activity を示す)

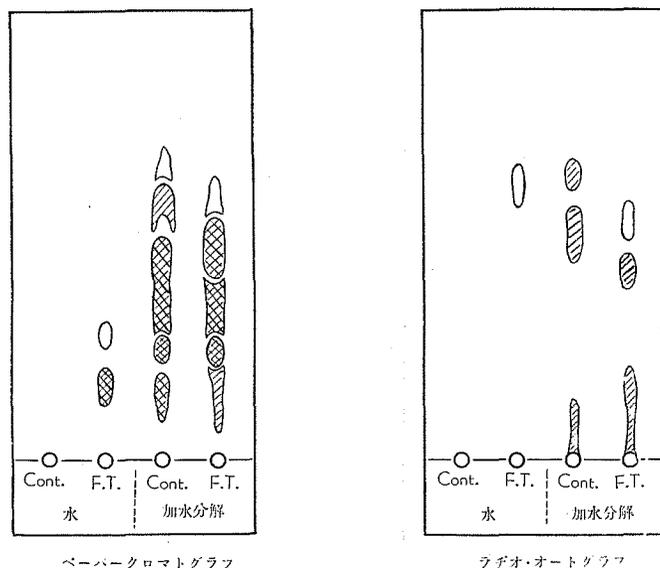
(1) 凍結融解直後 (2) 凍結融解後 27°C 15 時間孵置

解した後、処理直後と +27°C 静置 15 時間後の 2 回にわたり、水溶性分割、熱-アルコール・エーテル分割、残渣分割の三分割とする方法によつてその強度を測定した。

結果は第 17 図に示した様に、凍結融解直後では対照に比較して水溶性分割の C^{14} -放射能が増大し、残渣分割は減少、アルコール・エーテル分割では殆んど変化は見られなかつた。又 15 時間後では対照に於いても水溶性分割が多くなり残渣分割の ^{14}C は徐々に減少するが、この現象は凍結融解を行つたものでは著しい。しかしこの時でも熱-アルコール・エーテル分割の放射能の変化は僅少である。

この実験結果は細胞内の高分子の化合物に組入れられた ^{14}C が凍結融解処理によつて水溶性化され易いことを表わすものと考えられ、 ^{32}P によつて得られた結果、即ち ^{32}P のときは残渣分割の水溶性化は少ないことと異なつている。

次に予め C^{14} グルコースで標識した 100 mg/cc の菌液を 1 回凍結融解 (-190°C) した後、遠心沈澱によつて水溶性分割を得、沈澱を 17 N 塩酸によつて部分的加水分解を行い、対照と処理菌の差異をペーパークロマトグラフィ、ラジオ・オートグラフィでしらべた。



第 18 図 ^{14}C グルコースを用いた場合のペーパークロマトグラフ及びラジオ・オートグラフの模写図。スポットの網目、斜線、白はそれぞれ発色の強度又は放射能の強度が、強普通、弱であることをあらわす。

その結果の模写図は第 18 図に示すように、凍結融解菌液の水溶性分割のペーパークロマトグラフィではニンヒドリン反応陽性の物質とニンヒドリン陰性の物質の両者が増加しているがラジオ・オートグラフィによる検出法ではニンヒドリン陽性物質の ^{14}C 含量が高くないことが示された。この実験から凍結融解処理はアミノ基を含まぬ高分子の炭素化合物(多糖類と思

われる)の溶出をも促がすことが知られる。

[附] 凍結融解菌液中の正常形態を有する菌の割合

凍結融解によつて菌体は或る程度破壊されて消失するが、その破壊による消失が凍結温度の差によつてどのようなになるかを、 -30°C と -190°C でしらべてみた。即ち $10\text{mg}/\text{cc}$ の菌液 2.0cc を -30°C 及び -190°C で凍結融解した後、それぞれの菌液を1000倍まで稀釈してからThoma血球計算板に滴下し、光学顕微鏡でその形態を保つてい

る菌数を算定した。
その結果は第3表の通りで、凍結融解に於ける菌の形態保有率は無処理の対照を100%とすると、 -30°C では77.7%、 -190°C では78.6%となり、凍結温度による差は殆んどなかつた。なおこの算定には油浸装置を用いながつたので、形態の詳細な観察は出来なかつたが、形態を保っているものと破壊されたものとは明らかであり、破壊されたものは点状の破片として見られた。

第3表 凍結融解液中の正常形態を有する菌の割合

凍結処理	形態保有率 (%)
Cont.	100.0
-30°C	77.7
-190°C	78.6

IV. 考 察

凍結の微生物に及ぼす影響については古くから実験検討され多くの報告があるが、我々の教室に於いても以前よりこのことについて研究し多くの業績を残している。著者はこの研究の一部を担当し特に今まで省みられなかつた発育に対する影響を検討した。

この実験に用いた *Saccharomyces cerevisiae* は凍結実験を行うには便宜な点が多い。即ち、1) 酵母菌は大腸菌などに比較すると凍結処理に対する抵抗性はるかに低いため、凍結による影響はつきり現われること、2) この菌の形態は大きいので形態的観察が容易であり、従つて比較実験がしやすいことである。

さて $10\text{mg}/\text{cc}$ の酵母菌液をブライン(-30°C)及び液体空気(-190°C)で凍結融解したものを培養し発育曲線を求めてみると、 -30°C の場合は無処理のものと同じような発育曲線を示すが、 -190°C では誘導期は約12時間も延長した。この誘導期延長については既に述べた様に、生残菌自身の発育機能に障害をうけているか、或いはメジウム中に共存する死滅した菌体又は死滅菌体から游出した成分が阻害的に働くのかのいずれかであろうと考えられるが、次のような実験結果からかなり明らかにされた。即ち、1) 麦汁培地に死菌及び游出成分を更に加えても発育曲線に何らの変化もないこと、2) 凍結融解菌液(-190°C)を高度に稀釈しても、その誘導期は短縮しないこと、3) 凍結融解菌液をそのまま $+27^{\circ}\text{C}$ 、12時間孵置した結果誘導期はかなり短縮するとはいえ、正常にまで戻らないこと、4) 凍結融解後1回培養した菌の発育曲線は無処理の正常菌と殆んど同じような曲線を示し正常に復していることから、誘導期の延長は処理された時の当該菌だけの問題であり、その主因は凍結融解による生菌の障害にあると想像された。又 -190°C 凍結融解菌液をグルコース液、燐酸加里液及び蒸溜水に再浮游させ12

時間静置した実験及びその静置温度を変えた実験結果はこの想像を裏書きするものと思う。即ちグルコース添加によつて誘導期は著しく短縮し正常に復するが、燐酸加里のみでは正常に復しないことは、グルコースをエネルギー源として利用し、凍結融解による障害を修復することを意味するのであろう。従つて静置温度が低くなるほど代謝作用が抑制されて修復に時間を要するため、誘導期の正常に戻るのをおくれることになるものと思われる。なおこの修復には燐より糖が必要であり、修復完了には $+27^{\circ}\text{C}$ で約 12 時間かかるものと考えられる。

異化代謝能測定に於いては、凍結融解によつて醗酵能、呼吸能共に低下し、 -190°C では -30°C より更に低下することがわかつた。しかも凍結融解菌液はそれと同数の生菌を有する正常菌液よりはるかに大きな代謝能を有することになるが (-30°C では約 2 倍、 -190°C では約 20 倍)、既に実験成績の項に於いて述べたように、これについては生残菌自身の機能の昂進、生残菌がメジウム中の死菌又は菌体游出成分を利用して代謝を営むこと⁹⁾ 及び死滅菌自身が凍結融解直後ではまだ代謝機能を残存していることの 3 つの理由が考えられたが、就中第 3 の因子が主役を演ずるのであらうと想像される⁶⁾。又このことは、既に第 3 表に示した様に、凍結融解による死滅菌と雖も殆んど形態的な破壊がみとめられないことから、機能の残存が推定されるのである。しかしいづれにしても処理菌液中の生菌と死菌を厳密に分離できない限りは生残菌自身の役割と他のものとはつきり区別することは困難である。凍結融解によつて生残つた菌の代謝はかなり正常と異なつた様相を呈するが、凍結融解後 1 回培養すれば代謝能が正常に復する事実から、この様な変化は発育機能の場合と同様に、処理によつて障害をうけた当該菌だけのものであつて、次代にまで伝えられる遺伝的な変質でないことがわかる。

次に凍結融解後の菌体から溶出される成分のペーパークロマトグラフィなどによる実験結果を佐藤によつて報告された *Bac. meg.* のそれと¹²⁾ 比較してみたい。

放射性同位元素を用いた実験の結果から、凍結融解処理によつて細胞の微細構造特に膜の透過性に如何なる変化を生じているかがある程度推定できるので、甚だ興味深い。それは細胞内に導入された同位元素が凍結処理によつて水溶性化する現象に於いて、 ^{32}P と ^{14}C グルコースでは処理の影響を受ける分割が異なるということである。即ち、 ^{32}P を用いた場合は水に可溶性となる分割は冷-TCA 可溶性分割であるのに対し、 ^{14}C を用いると熱-アルコール-エーテルによつて抽分されない部分が水溶性となり、一見矛盾した結果であるように見える。しかもラジオ・オートグラフィによれば ^{14}C によつて標識された化合物で可水溶性となる大部分はアミノ基を有しない (勿論燐酸基も含めぬ)。このことはその化合物が比較的単純な炭水化物であつて細胞の表層を構成する物質の分層であらうと推察される¹⁵⁾。従つて凍結融解処理が細胞表層を破壊し、無処理菌では水に溶出されない冷-TCA 可溶性の比較的 low molecular weight の燐酸化合物を容易に透過せしめるように変化させることを予想させる。しかし単純な炭水化物のみが細胞表層の主たる構成要素と考えるわけにはいかないから、凍結融解が如何にして細胞構造を損傷するかについての充分な証拠を得ているとは云い難い。

ところで本実験及び *Bac. meg.* による佐藤の実験で共通な結果は、細胞内の脂質又はそ

れに類する物質内に導入された ^{32}P は凍結処理によつて水溶性にならないということである。これは脂質に類する化合物には燐酸やグルコース中の炭素が導入され難いことと関連を有することかも知れない。実験に用いた酵母及び *Bac. meg.* は定常期のものであるから貯蔵脂質が少ないと予想され、細胞のかなり強固な構造として存在する脂質のみしか存在せず、それは凍結融解によつては殆んど解離されないのか或いは解離されても水に不溶という脂質本来の性質によつて細胞内にとどまっているのかの何れかであろう。蛋白質に結合している脂質は凍結融解によつて解離することが知られているが¹⁸⁾、ここに行つた実験では多量のリボ蛋白を含む細胞を扱わなかつたから関連性を論議することは出来ない。

最後に各実験成績の関連性について述べると、 -190°C 凍結融解菌液の誘導期延長は生残菌自身の障害によると考えられたが、抽出分割及びペーパークロマトグラフィの実験に於いて低分子の化合物及び2種類の水溶性のアミノ化合物の溶出が見られ、一方凍結融解菌液の光学顕微鏡的観察で菌の大多数は元の形態を保つてゐること及び ^{14}C を用いたラジオ・オートグラフィからは単純なる炭水化物が見られることと考え合せて、この障害は細胞膜の部分的破損による膜の透過性の増大であると想像される。凍結融解菌液をグルコース液に再浮遊させ12時間孵置した結果誘導期は正常に復することから、グルコースをエネルギー源として利用し、うけた障害を修復するものと考えたが、異化代謝能測定に於いて明らかに生残菌が利用すると思われる菌体游出成分を除くと、誘導期はやはり12時間も延長することは、この考えを更に裏書きすると思う。

以上のように本実験の結果に含まれる問題を考察したが、凍結融解処理によつて酵母細胞に与えられる障害には種々の程度があり、生残菌でも誘導期の延長という現象に示されるような機能的変化が見られ、細胞構造が破壊されるにしても、限られた種類の物質が水抽出され易くなるというように特定の構造に強く現われることは、凍結処理の問題を追求するのに重要な手懸りを与えるものと思われる。しかしまだ多くの問題が残つており、更に今後の研究にまたなければならぬものと考えている。

V. 結 言

微生物について凍結融解の發育及び代謝に及ぼす影響を見るために、*Sacch. cerev.* を用いて検討した結果次の様な結論を得た。

1) -30°C 凍結融解菌は無処理の正常菌と同様の發育曲線を示すが、 -190°C 凍結融解菌の誘導期は約12時間も延長した。この誘導期延長の原因は、麦汁培地に死菌及び菌体游出成分を更に加えても凍結融解菌液を高度に稀釈しても發育曲線に何らの変化のないこと、凍結融解菌液をそのまま $+27^{\circ}\text{C}$ 12時間孵置すると、誘導期はかなり短縮するが正常にまで戻らないことなどから、凍結融解による生菌自身の障害にあると想像される。又凍結融解菌液にグルコースを加えて12時間孵置した結果、誘導期は著しく短縮し正常に復することから、グルコースをエネルギー源として利用して障害を修復するものと考えられた。

2) 異化代謝能については、凍結融解によつて醗酵能、呼吸能共に低下し、殊に -190°C のもの -30°C のものより更に低下することをみとめた。しかも -190°C 凍結融解菌液は正常菌液に比較すると生菌数の割にしてはるかに大きな代謝能を有する。これは正常菌に死菌液を加えたり、凍結融解菌液に正常菌を加えたりして検討した結果、生菌は明らかに死菌及び菌体游出成分を利用していると思われた。 $+27^{\circ}\text{C}$ 孵置で正常菌は殆んど変わらないのに凍結融解菌の代謝が急に低下することと、凍結融解による死滅菌であつても形態的には殆んど破壊がみとめられないことから、死滅菌にも処理直後にはまだ代謝機能の残存していることが推定された。

3) ^{32}P 及び ^{14}C グルコースで標識された凍結融解菌液の抽出分割及びペーパークロマトグラフィによつて、低分子の化合物(糖、游離脂肪酸、エステル、塩基等)及び可水溶性の2種類のアミノ化合物の溶出が見られた。凍結融解菌の形態とラジオ・オートグラフィの成績とを考へ合せて、細胞膜の透過性の増大が想像された。

摺筆に当り終始御懇篤な御指導を賜つた恩師根井外喜男教授に衷心より謝意を表すると共に、種々御教示を戴きました林喬義助教授に、また多大の御援助を戴きました二瓶泰一博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Haines, R. B. 1938 The effect of freezing on bacteria. Proc. Roy. Soc. London B, **124**, 451.
- 2) Weiser, R. S. & C. M. Osterud, 1945 Studies on the death of bacteria at low temperature. I. J. Bact., **50**, 413.
- 3) Harrison, A. P. 1955 Survival of bacteria upon repeated freezing and thawing J. Bact., **70**, 711.
- 4) Mazur, P., M. A. Rhian & B. G. Mahlandt, 1957 Survival of *Pasteurella tularensis* in sugar solutions after cooling and warming at sub-zero temperatures J. Bact., **73**, 394.
- 5) Mazur, P., M. A. Rhian & B. G. Mahlandt, 1957 Survival of *Pasteurella tularensis* in gelatin-saline after cooling and warming at subzero temperatures. Arch. Biochem. Biophys., **71**, 31.
- 6) Hansen, I. A. & P. M. Nossal, 1955 Morphological and biochemical effects of freezing on yeast cells. Biochim. Biophys. Acta, **16**, 502.
- 7) 根井外喜男 1954 酵母の凍結過程. 日農化., **28**, 91.
- 8) 根井外喜男 外3名 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響. 日農化., **28**, 94.
- 9) 大原吉輝 1954 凍結融解の細菌呼吸に及ぼす影響の機序について. 低温科学, 生物篇, **12**, 1.
- 10) 佐藤 徹 1954 低温処理による細菌死滅の機序について. 低温科学, 生物篇, **12**, 39.
- 11) 根井外喜男, 佐々木芳郎 1955 凍結融解による菌体の破壊. 科学, **25**, 86.
- 12) 佐藤正一 1958 凍結融解又は凍結乾燥による *Bacillus megatherium* の形態的並びに機能的変化について. 低温科学, 生物篇, **16**, 109.
- 13) Proom, H. & L. M. Hemmons, 1949 The drying and preservation of bacterial cultures. J. Gen. Microbiol., **3**, 7.
- 14) Fry, R. M. & R. I. N. Greaves, 1951 The survival of bacteria during and after drying. J.

Hygiene, **49**, 220.

- 15) 橋谷義孝 1949 酵母学. 岩波書店.
- 16) Schneider, W. C. 1945 Phosphorus compounds in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 293.
- 17) Steele, R., T. Sfortunato & L. Ottolenghi, 1949 A micromethod for the determination of the nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **177**, 231.
- 18) Oucley, J. L., F. R. N. Gurd & M. Melin, 1950 Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXV. Composition and properties of human serum β -lipoprotein. *J. Amer. Chem. Soc.*, **72** 458.

Résumé

Until the present date a few studies by other investigators have been made concerned with the effects of freeze-thawing on the cell structure of micro-organisms, but effects on their growth have not yet been made clear.

The following experiments were carried out by the author in order to elucidate the behavior of yeast cells in their growing and metabolic processes as influenced by freezing and thawing.

Lag phase in growth curve of cells frozen at -190°C and thawed was prolonged as long as 12 hours, while the lag phase of the one treated at -30°C was identical with that of normal untreated one. As a result of experiments repeatedly performed by the use of various treatments to clarify the reason for such a fact, it was found that the prolongation of lag phase is required for the cellular structures to recover from destruction caused by freezing and thawing and that glucose is utilized as a substrate, presumably as one of the energy sources, at this phase.

Activity in fermentation and aerobic respiration of yeast cells was reduced by freezing and thawing, in particular, by freezing at -190°C more than at -30°C . The ratio of metabolic activity of the cell suspensions treated at -190°C to numbers of cell survivors in the same material was greater than that in normal ones. According to several investigations undertaken to explain this fact, it was assumed that even the dead cells in the treated suspensions might to some extent retain their catabolic activity for a short time and that the dead cells and/or cell fragments might be employed by living cells for their catabolic metabolism as substrates.

Using radioactive glucose, of which the carbons were labelled with ^{14}C , and phosphate ($^{32}\text{PO}_4$), paper-chromatography and radio-autography of the cell fractions extracted from normal and treated materials were performed. The results thus obtained were as follows: water solubility of some of the cell constituents was increased by freezing and thawing, so that the water soluble fraction in the treated materials contained substances, which were low in molecular weight, such as sugars, fatty acids, esters and amino compounds, more in amount than those in the untreated ones. In particular, the two of sorts of amino compounds became more soluble in water due to freeze-thawing. Considering the relationship between such an extractability of cell components and the destruction of cells, it was assumed that the permeability of cell membrane was increased by freezing and thawing.